

10/763, 249

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 1 0 月 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 3 1 0 5 4 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 1 - 3 1 0 5 4 7]

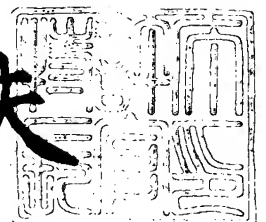
願 人 味の素株式会社
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年 2 月 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 5 0 3 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 2001-233

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1
 味の素株式会社アミノサイエンス研究所内

【氏名】 横関 健三

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1
 味の素株式会社アミノサイエンス研究所内

【氏名】 鈴木 園子

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1
 味の素株式会社アミノサイエンス研究所内

【氏名】 野崎 博之

【特許出願人】

 【識別番号】 0000000066

 【氏名又は名称】 味の素株式会社

 【代表者】 江頭 邦雄

 【電話番号】 044-244-7182

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 011202

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ジペプチドの製造方法、それに用いるペプチド生成酵素、およびペプチド生成酵素の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アクロモバクター属、アシネトバクター属、エアロモナス属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アースロバクター属、バチルス属、ベイジェリンキア属、ブレヴィバクテリウム属、クラビバクター属、クリセオバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、エンペドバクター属、エンテロバクター属、エルビニア属、フラボバクテリウム属、クルイヘラ属、ミクロバクテリウム属、ミクロコッカス属、ミコプラナ属、パントテア属、プロピオニバクテリウム属、シュードモナス属、リストネラ属、リゾビウム属、ロドコッカス属、サルモネラ属、ザルチナ属、セラチア属、ステノトロホモナス属、スタフィロコッカス属、ストレプトマイセス属、ビブリオ属、キサントモナス属、ブレラ属、キャンディダ属、クリプトコッカス属、フィロバシディウム属、ジオトリカム属、パキソレン属、ロドスポリジウム属、ロドトルラ属、サッカロミセス属、スポロプロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、またはトルロプシス属に属し、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物、または、該微生物に由来するペプチド生成酵素を用いて、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

【請求項 2】 L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物、または、該微生物に由来するペプチド生成酵素を用いて、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを製造する際に、反応液にエチレンジアミン四酢酸（EDTA）等の金属酵素の阻害剤を添加することを特徴とする請求項 1 記載のジペプチドの製造方法。

【請求項 3】 前記L-アミノ酸エステルは、L-アラニンエステルであることを特徴とする請求項 1～2 のいずれか 1 つに記載のジペプチドの製造方法。

【請求項4】 前記L-アミノ酸は、L-グルタミンまたはL-アスパラギンであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1つに記載のジペプチドの製造方法。

【請求項5】 アクロモバクター属、アシネトバクター属、エアロモナス属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アースロバクター属、バチルス属、ベイジェリンキア属、ブレヴィバクテリウム属、クラビバクター属、クリセオバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、エンペドバクター属、エンテロバクター属、エルビニア属、フラボバクテリウム属、クルイヘラ属、ミクロバクテリウム属、マイクロコッカス属、ミコプラナ属、パントテア属、プロピオニバクテリウム属、シュードモナス属、リストネラ属、リゾビウム属、ロドコッカス属、サルモネラ属、ザルチナ属、セラチア属、ステノトロホモナス属、スタフィロコッカス属、ストレプトマイセス属、ビブリオ属、キサントモナス属、ブレラ属、キャンディダ属、クリプトコッカス属、フィロバシディウム属、ジオトリカム属、パキソレン属、ロドスポリジウム属、ロドトルラ属、サッカロミセス属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、またはトルロプシス属に属する微生物から得られ、かつ、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒することを特徴とするペプチド生成酵素。

【請求項6】 アクロモバクター属、アシネトバクター属、エアロモナス属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アースロバクター属、バチルス属、ベイジェリンキア属、ブレヴィバクテリウム属、クラビバクター属、クリセオバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、エンペドバクター属、エンテロバクター属、エルビニア属、フラボバクテリウム属、クルイヘラ属、ミクロバクテリウム属、マイクロコッカス属、ミコプラナ属、パントテア属、プロピオニバクテリウム属、シュードモナス属、リストネラ属、リゾビウム属、ロドコッカス属、サルモネラ属、ザルチナ属、セラチア属、ステノトロホモナス属、スタフィロコッカス属、ストレプトマイセス属、ビブリオ属、キサントモナス属、ブレラ属、キャンディダ属、クリプトコッカス属、フィロバシディウム属、ジオトリカム属、パキソレン属、ロドスポリジウム属、ロドトルラ属、サッカロミセ

ス属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、またはトルロプシス属に属する微生物を培地中で培養し、培養液中および／または菌体内にＬ－アミノ酸エステルとＬ－アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するペプチド生成酵素を蓄積させることを特徴とするペプチド生成酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ安価にジペプチドを製造する方法に関し、より詳細には、Ｌ－アミノ酸エステルとＬ－アミノ酸とからジペプチドを製造する方法、当該ジペプチドの製造方法に使用するペプチド生成酵素およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ジペプチドは、医薬品素材、機能性食品等のさまざまな分野で利用されている。例えば、Ｌ－アラニル－Ｌ－グルタミンは無血清培地の成分として有用であり、Ｌ－グルタミンに比べ安定で、水溶性も高いことから輸液成分に用いられる。

【0003】

ジペプチドの製造法としては従来から化学合成法が知られているが、その製造法は必ずしも簡便なものではなかった。例えば、Ｎ－ベンジルオキシカルボニルアラニン（以下Ｚ－アラニンと称する）と保護Ｌ－グルタミンを用いる方法（Bull.Chem.Soc.Jpn., 34, 739(1961)、Bull.Chem.Soc.Jpn., 35, 1966(1962)）、Ｚ－アラニンと保護Ｌ－グルタミン酸－γ－メチルエステルを用いる方法（Bull.Chem.Soc.Jpn., 37, 200(1964)）、Ｚ－アラニンエステルと無保護グルタミン酸を用いる方法（特開平1-96194号公報）、２－置換－プロピオニルハロイドを原料として、Ｎ－（２－置換）－プロピオニルグルタミン誘導体を中間体として合成する方法（特開平6-234715号公報）等が知られている。

【0004】

しかしながら、いずれの方法においても、保護基の導入脱離、もしくは中間体の合成が必要であり、工業的に有利で十分に満足できる製造方法ではなかった。

【0005】

酵素を用いたジペプチドの代表的製造法としては、N保護、C無保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる縮合反応（反応1）、およびN保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応（反応2）が知られており、反応1の例としては、Z-アスパラギン酸とフェニルアラニンメチルエステルからのZ-アスパルチルフェニルアラニンメチルエステルの製造方法（特開昭53-92729号公報）、（反応2）の例としてはアセチルフェニルアラニンエチルエステルとロイシンアミドからのアセチルフェニルアラニルロイシンアミドの製造方法（Biochemical J., 163, 531 (1977)）が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分を用いる方法の研究報告例は極めて少なく、N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応（反応3）の例としては特許W0 90/01555があり、例えばアルギニンエチルエステルとロイシンアミドからのアルギニルロイシンアミドの製造方法が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C無保護のアミン成分を用いる置換反応（反応4）の例としては、特許EP 278787Aがあり、例えばチロシンエチルエステルとアラニンからのチロシルアラニンの製造方法が挙げられる。これらの方法の中で最も安価な製造方法となり得るのは、当然ながら保護基の数が最も少ない反応4の範疇に入る反応である。

【0006】

しかしながら、反応4の先行例（特許EP 278787A）に使用する酵素は、カビ、植物に由来する比較的高価なcarboxypeptidase標品を用いており、また生産されるジペプチドも比較的高水度の高いアミノ酸を含むものであった。反応4において、細菌および酵母由来の酵素を用いる方法は全く知られておらず、また親水性の高いアラニルグルタミンやアラニルアスパラギンの製造方法についても全く知られていなかった。このような背景の下、これらペプチドの工業的安価な製造法の開発が望まれていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、安価に入手可能な出発原料と安価に供給できる酵素源（微生物の培

養物、微生物菌体、菌体処理物等)を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記目的に鑑み鋭意研究を重ねた結果、本発明者らは安価に培養できる、ある種の細菌、酵母に属する微生物が、安価に入手可能なL-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明は、以下のとおりである。

【0010】

(請求項1) アクロモバクター属、アシネトバクター属、エアロモナス属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アースロバクター属、バチルス属、ベイジェリンキア属、ブレヴィバクテリウム属、クラビバクター属、クリセオバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、エンペドバクター属、エンテロバクター属、エルビニア属、フラボバクテリウム属、クルイヘラ属、ミクロバクテリウム属、マイクロコッカス属、ミコプラナ属、パントテア属、プロピオニバクテリウム属、シュードモナス属、リストネラ属、リゾビウム属、ロドコッカス属、サルモネラ属、ザルチナ属、セラチア属、ステノトロホモナス属、スタフィロコッカス属、ストレプトマイセス属、ビブリオ属、キサントモナス属、ブレラ属、キャンディダ属、クリプトコッカス属、フィロバシディウム属、ジオトリカム属、パキソレン属、ロドスポリジウム属、ロドトルラ属、サッカロミセス属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、またはトルロプシス属に属し、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する細菌、酵母の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物、または、該微生物に由来するペプチド生成酵素を用いて、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

【0011】

(請求項2) L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する細菌、酵母の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物、または、該微生物に由来するペプチド生成酵素を用いて、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造する際、反応液にエチレンジアミン四酢酸(EDTA)等の金属酵素の阻害剤を添加することを特徴とする請求項1記載のジペプチドの製造方法。

【0012】

(請求項3) 前記L-アミノ酸エステルは、L-アラニンエステルであることを特徴とする請求項1～2のいずれか1つに記載のジペプチドの製造方法。

【0013】

(請求項4) 前記L-アミノ酸は、L-グルタミンまたはL-アスパラギンであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1つに記載のジペプチドの製造方法。

【0014】

(請求項5) アクロモバクター属、アシネトバクター属、エアロモナス属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アースロバクター属、バチルス属、ベイジェリンキア属、ブレビバクテリウム属、クラビバクター属、クリセオバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、エンペドバクター属、エンテロバクター属、エルビニア属、フラボバクテリウム属、クルイヘラ属、ミクロバクテリウム属、ミクロコッカス属、ミコプラナ属、パントテア属、プロピオニバクテリウム属、シュードモナス属、リストネラ属、リゾビウム属、ロドコッカス属、サルモネラ属、ザルチナ属、セラチア属、ステノトロホモナス属、スタフィロコッカス属、ストレプトマイセス属、ビブリオ属、キサントモナス属、ブレラ属、キャンディダ属、クリプトコッカス属、フィロバシディウム属、ジオトリカム属、パキソレン属、ロドスポリジウム属、ロドトルラ属、サッカロミセス属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、またはトルロプシス属に属する微生物から得られ、かつ、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒することを特徴とするペプチド生成酵素。

【0015】

(請求項6) アクロモバクター属、アシネトバクター属、エアロモナス属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アースロバクター属、バチルス属、ベイジェリンキア属、ブレビバクテリウム属、クラビバクター属、クリセオバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、エンペドバクター属、エンテロバクター属、エルビニア属、フラボバクテリウム属、クルイヘラ属、ミクロバクテリウム属、ミクロコッカス属、ミコプラナ属、パントテア属、プロピオニバクテリウム属、シュードモナス属、リストネラ属、リゾビウム属、ロドコッカス属、サルモネラ属、ザルチナ属、セラチア属、ステノトロホモナス属、スタフィロコッカス属、ストレプトマイセス属、ビブリオ属、キサントモナス属、ブレラ属、キャンディダ属、クリプトコッカス属、フィロバシディウム属、ジオトリカム属、パキソレン属、ロドスポリジウム属、ロドトルラ属、サッカロミセス属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、またはトルロプシス属に属する微生物を培地中で培養し、培養液中および／または菌体内にL-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するペプチド生成酵素を蓄積させることを特徴とするペプチド生成酵素の製造方法。

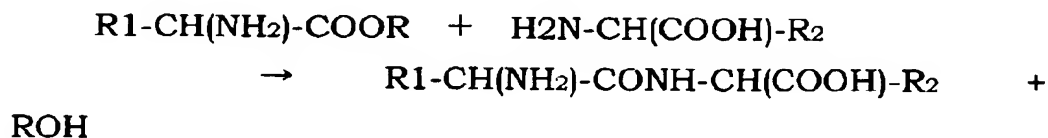
【0016】

【発明の実施の形態】

本発明のジペプチドの製造方法は、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いることを特徴とする。本発明のジペプチドの製造方法における反応は下記反応式により表される。

【0017】

【化1】



(Rはアルコールの側鎖、R₁はL-アミノ酸エステルの側鎖、R₂はL-アミノ酸の側鎖を表す)

【0018】

アミノ酸エステルは、安価に入手可能な化合物である。アミノ酸エステルと無保護アミノ酸を出発原料として、細菌、酵母を酵素源として水溶液中で反応せしめる本発明の方法は、従来にはない新しいジペプチドの製造方法であり、医薬品素材、機能性食品として有用なジペプチドをより安価に提供することを可能とするものである。

【0019】

以下、本発明のジペプチドの製造方法を、

〔I〕 L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有

する微生物

〔II〕 ペプチド生成酵素の性質

〔III〕 ジペプチドの製造方法

の順に詳細に説明する。

【0020】

〔I〕 L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物

本発明に使用する微生物としては、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物を特に限定なく使用することができる。L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物としてはアクロモバクター属、アシネトバクター属、エアロモナス属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アースロバクター属、バチルス属、ベイジェリンキア属、ブレヴィバクテリウム属、クラビバクター属、クリセオバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、エンペドバクター属、エンテロバクター属、エルビニア属、フラボバクテリウム属、クルイヘラ属、ミクロバクテリウム属、マイクロコッカス属、ミコプラナ属、パントテア属、プロピオニバクテリウム属、シュードモナス属、リストネラ属、リゾビウム属、ロドコッカス属、サルモネラ属、ザルチナ属、セラチア属、ステノトロホモナス属、スタフィロコッカス属、ストレプトマイセス属、ビブリオ属、キサントモナス属、

ブレラ属、キャンディダ属、クリプトコッカス属、フィロバシディウム属、ジオトリカム属、パキソレン属、ロドスポリジウム属、ロドトルラ属、サッカロミセス属、スポロブロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、またはトルロプシス属に属する微生物を挙げることができるが、具体的には以下のものを例示することができる。

【 0 0 2 1 】

アクロモバクター デルマーベ FERM BP-6988

(*Achromobacter delmarvae*)

アシネトバクター ジョンソニイ ATCC 9036

(*Acinetobacter johnsonii*)

エアロモナス サルモニシダ ATCC 14174

(*Aeromonas salmonicida*)

アグロバクテリウム ツメファシエンス IFO 3058

(*Agrobacterium tumefaciens*)

アルカリゲネス フェカリス ATCC 8750

(*Alcaligenes faecalis*)

アースロバクター シトレウス ATCC 11624

(*Arthrobacter citreus*)

バチルス ズブチリス ATCC 6633

(*Bacillus subtilis*)

ベイジェリンキア インディカ ATCC 9037

(*Beijerinckia indica*)

ブレビバクテリウム ローゼウム ATCC 13825

(*Brevibacterium roseum*)

クラビバクター ミシガネンス ATCC 7429

(*Clavibacter michiganense*)

クリセオバクテリウム メニンゴセプティカム ATCC 13253

(*Chryseobacterium meningosepticum*)

コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286

(*Corynebacterium glutamicum*)

シェリヒア コリ ATCC 13071

(*Escherichia coli*)

エンペドバクター ブレビス FERM P-18545

(*Empedobacter brevis*)

エンテロバクター エアロゲネス ATCC 13048

(*Enterobacter aerogenes*)

エルビニア アミロボーラ IFO 12687

(*Erwinia amylovora*)

フラボバクテリウム レジノボーラム ATCC 12524

(*Flavobacterium resinovorum*)

クルイヘラ シトロフィラ FERM BP-6564

(*Kluyvera citrophila*)

ミクロバクテリウム インペリアエ ATCC 8365

(*Microbacterium imperiale*)

ミクロコッカス ルテウス ATCC 11880

(*Micrococcus luteus*)

ミコプラナ ブラータ ATCC 4278

(*Mycoplana bullata*)

パントエア アナナティス ATCC 23822

(*Pantoea ananatis*)

プロピオニバクテリウム シェルマーニ FERM P-9737

(*Propionibacterium shermanii*)

シュードモナス プチダ FERM P-18544

(*Pseudomonas putida*)

リストネラ アングイラーラム ATCC 19264

(*Listonella anguillarum*)

リゾビウム ラジオバクター ATCC 4720

(*Rhizobium radiobacter*)

ロドコッカス ロドクラウス ATCC 21198

(*Rhodococcus rhodochrous*)

サルモネラ チフィムリウム FERM BP-6566

(*Salmonella typhimurium*)

ザルチナ ルテア FERM BP-6562

(*Sarcina lutea*)

セラチア グリメシイ ATCC 14460

(*Serratia grimesii*)

スタフィロコッカス アウレウス ATCC 12600

(*Staphylococcus aureus*)

ステノトロホモナス マルトフィリア ATCC 13270

(*Stenotrophomonas maltophilia*)

ストレプトマイセス ラベンデュラエ ATCC 11924

(*Streptomyces lavendulae*)

ビブリオ チロゲネス FERM BP-5848

(*Vibrio tyrogenes*)

キサントモナス マルトフィリア FERM BP-5568

(*Xanthomonas maltophilia*)

ブレラ アルバ FERM P-8032

(*Bullera alba*)

キャンディダ クルゼイ IFO 0011

(*Candida krusei*)

クリプトコッカス テレウス IFO 0727

(*Cryptococcus terreus*)

フィロバシディウム カプスリゲナム IFO 1119

(*Filobacidium capsuligenum*)

ジオトリクム アミセリウム ATCC 56046

(*Geotrichum amycelium*)

パキソレン タンノフィラス IFO 1007

(*Pachysolen tannophilus*)

ロドスポリジウム デイオボバータム IFO 1829

(*Rhodosporidium diobovatum*)

ロドトルラ ミヌタ IFO 0879

(*Rhodotorula minuta*)

サッカロミセス ユニスポーラス IFO 0724

(*Saccharomyces unisporus*)

スポロボロミセス サルモニカラー IFO 1038

(*Sporoboromyces salmonicolor*)

トレメラ フォリアセ IFO 9297

(*Tremella foliacea*)

トルラスポーラ デルブルッキ IFO 1083

(*Torulaspora delbrueckii*)

トルロプシス インゲニオーサ FERM P-665

(*Torulopsis ingeniosa*)

【 0 0 2 2 】

上記菌株のうち、ATCC番号が記載されているものは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (P.O.Box 1549 Manassas, VA 20110) に寄託されており、各番号を参照して分譲を受けることができる。上記菌株のうち、IFO番号が記載されているものは、財団法人 発酵研究所 (〒532-8686 大阪市淀川区十三本町2丁目17-85) に寄託されており、各番号を参照して分譲を受けることができる。

【 0 0 2 3 】

上記菌株のうち、FERM番号が記載されているものは、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター (〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6) に寄託され、受託番号が付与された微生物である。アクロモバクター デルマーベ FERM BP-6988は、1998年1月16日に原寄託がなされ2000年1月6日に国際寄託に移管されている。クルイヘラ シトロフィラ FERM BP-6564は、1

985年4月23日に原寄託がなされ、1998年11月2日に国際寄託に移管されている。プロピオニバクテリウム シェルマーニ FERM P-9737は、1987年12月4日に原寄託がされている。サルモネラ チフィムリウム FERM BP-6566は、1987年7月11日に原寄託がなされ、1998年11月2日に国際寄託に移管されている。ザルチナルテア FERM BP-6562は、1984年1月20日に原寄託がなされ、1998年11月2日に国際寄託に移管されている。ビブリオ チロゲネス FERM BP-5848は、1983年4月25日に原寄託がなされ、1997年3月4日に国際寄託に移管されている。キサントモナス マルトフィリア FERM BP-5568は、1995年6月14日に原寄託がなされ、1996年6月14日に国際寄託に移管されている。ブレラ アルバ FERM P-8032は、1984年12月24日に原寄託がなされている。トルロプシス インゲニオーサ FERM P-665は、1970年8月24日に原寄託がなされている。エンペドバクター プレビス AJ-13933株とシュードモナス プチダ AJ-2402株は、2001年10月1日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託され、AJ-13933はFERMP-18545、AJ-2402はFERM P-18544の受託番号が付与されている。尚、AJ-2402(FERM P-18544) は、以下の分類実験により、上述のシュードモナス プチダであることが同定された。

FERM P-18544は、桿菌 ($0.7\sim0.8\times1.5\sim2.0\mu\text{m}$)、グラム陰性、孢子形成なし、運動性あり、コロニー形態は円形、全縁滑らか、凸状、光沢あり、クリーム色、 30°C で生育、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、OFテスト(グルコース)陰性の性質より、運動性を有する無孢子桿菌であり、シュードモナスに属する細菌と同定された。更に、硝酸塩還元陰性、インドール産生陰性、グルコースからの産生陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陽性、ウレアーゼ陰性、エスクリン加水分解陰性、ゼラチン加水分解陰性、 β -ガラクトシダーゼ陰性、グルコース資化陽性、L-アラビノース資化陰性、D-マンノース資化陽性、D-マンニトール資化陽性、N-アセチル-D-グルコサミン資化陰性、マルトース資化陰性、グルコン酸カリウム資化陽性、n-カプリン酸陽性、アジピン酸資化陰性、d-1-リンゴ酸資化陽性、クエン酸ナトリウム資化陽性、酢酸フェニル資化陽性、オキシダーゼ陽性、King's B寒天培地での蛍光色素生産陽性、ショ糖からのレバン産生陽性、ソルビトールの資化微弱という生理学的性質よりシュードモナス

プチダ (*Pseudomonas putida*) と同定された。

【 0 0 2 4 】

これらの微生物としては、野生株または変異株のいずれを用いてもよいし、また、細胞融合もしくは遺伝子操作などの遺伝学的手法により誘導される組み換え株等も用いることができる。

【 0 0 2 5 】

このような微生物の菌体を得るには、当該微生物を適当な培地で培養増殖せしめるとよい。このための培地はその微生物が増殖し得るものであれば特に制限はなく、通常の炭素源、窒素源、リン源、S源、無機イオン、更に必要に応じ有機栄養源を含む通常の培地でよい。

【 0 0 2 6 】

例えば、炭素源としては上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フラクトース、マルトース、アミロース等の糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類及びこれらの塩類、パラフィンなどの炭水化物類あるいはこれらの混合物などを使用することができる。

【 0 0 2 7 】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの無機塩のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの有機窒素化合物あるいはこれらの混合物を使用することができる。

【 0 0 2 8 】

他に無機塩類、微量金属塩、ビタミン類等、通常の培地に用いられる栄養源を適宜混合して用いることができる。

【 0 0 2 9 】

培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好氣的条件下にて pH 5 ～ 8、温度 15 ～ 40℃ の範囲で pH および温度を適当に制限しつつ 12 ～ 48 時間程度培養を行えばよい。

【0030】**〔II〕 ペプチド生成酵素の性質**

つぎに、上記微生物のうち、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13286 から精製されたペプチド生成酵素の性質について説明する。

【0031】

当該ペプチド生成酵素は、少なくとも L-アラニンエステルと L-グルタミンを基質とし L-アラニル-L-グルタミンを生成する活性、および、L-アラニンエステルと L-アスパラギンを基質とし L-アラニル-L-アスパラギンを生成する活性を有するものである。

【0032】

作用としては、L-アラニンエステル 1 分子と L-グルタミン 1 分子から L-アラニル-L-グルタミン 1 分子とアルコール 1 分子を生成、L-アラニンエステル 1 分子と L-アスパラギン 1 分子から L-アラニル-L-アスパラギン 1 分子とアルコール 1 分子を生成する。

【0033】

至適 pH は 6.0 から 10.0 付近にあり、至適温度は 30 から 50℃ 付近にある。サブユニットの分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって 42,000 ~ 46,000 と算出される。

【0034】**〔III〕 ジペプチドの製造方法**

本発明のジペプチドの製造方法は、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または、該微生物の菌体処理物を用いて、L-アミノ酸エステルおよび L-アミノ酸からジペプチドを製造するものである。

【0035】

上記微生物の産生するペプチド生成酵素は、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸を基質としてジペプチドを生成する活性を有するものである。

【0036】

上記微生物の産生するペプチド生成酵素を L-アミノ酸エステルおよび L-ア

ミノ酸に作用せしめる方法としては、上記微生物を培養しながら、培養液中に直接基質を添加してもよいし、培養終了後の培養液あるいは微生物培養物から遠心分離等により菌体を分離し、これをそのままもしくは洗浄した後、緩衝液に再懸濁したものにL-アミノ酸エステル-アミノ酸を添加して反応させてもよい。あるいは、ポリアクリルアミドゲル法、カラギーナン法、アルギン酸ゲル法等の公知の方法で固定化した菌体を用いることができる。

【0037】

また、微生物菌体の処理物として、菌体破砕物、アセトン処理菌体、凍結乾燥菌体を用いてもよい。菌体破砕には超音波破砕、フレンチプレス破砕、ガラスビーズ破砕等の方法を用いることができ、また溶菌させる場合には卵白リゾチームや、ペプチターゼ処理、またはこれらを適宜組み合わせた方法が用いられる。

【0038】

さらに、当該微生物菌体処理物からペプチド生成酵素を回収し、粗酵素液として使用してもよいし、必要に応じて、酵素を精製して用いてもよい。培養物からの精製法としては通常の酵素精製法をもちいることができる。具体的には遠心分離等によって菌体を集め、超音波処理、ガラスビーズ、ダイノミルなどの機械的方法によって菌体を破砕し、細胞片等の固形物を遠心分離によって除き、粗酵素を得て、超遠心分離分画、塩析、有機溶媒沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等を行うことによって上述のペプチド生成酵素が精製される。なお、「微生物に由来するペプチド生成酵素」とは、当該微生物菌体処理物から上記精製工程を経て得られた酵素のみならず、当該酵素の遺伝子を異種または同種の宿主において発現させることによる、いわゆる遺伝子工学的手法によって生産された酵素をも含む。

【0039】

すなわち、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有する画分であれば、酵素と当該酵素含有物全てを使用することが可能である。ここで「酵素含有物」とは、当該酵素を含むものであればよく、具体的には培養物、培養菌体、洗浄菌体、菌体を破砕あるいは溶菌させた菌体処理物、粗

酵素液、精製酵素などを含む。

【0040】

なお、培養物、培養菌体、洗浄菌体、菌体を破碎あるいは溶菌させた菌体処理物を用いる場合には、ペプチドの生成に関与せずに生成ペプチドを分解する酵素が存在することが多く、この場合には、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような金属プロテアーゼ阻害剤を添加するほうが好ましいばあいがある。添加量は、0.1mMから100mM の範囲で、好ましくは1mMから50mMである。

【0041】

酵素または酵素含有物の使用量は、目的とする効果を発揮する量（有効量）であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められるが、例えば洗浄菌体を用いる場合は反応液1リットル当たり1～500gである。

【0042】

L-アミノ酸エステルとしては、当該ペプチド生成酵素の基質特異性においてL-アミノ酸とジペプチドを生成できるL-アミノ酸エステルであればいかなるものも使用でき、例えば、L-アミノ酸のメチルエステル、エチルエステル、n-プロピルエステル、iso-プロピルエステル、n-ブチルエステル、iso-ブチルエステル、tert-ブチルエステル等が挙げられる。また、天然型のアミノ酸に対応したL-アミノ酸エステルだけでなく、非天然型のアミノ酸もしくはその誘導体に対応するL-アミノ酸エステルも使用可能である。

【0043】

L-アミノ酸としては、当該ペプチド生成酵素の基質特異性においてL-アミノ酸エステルとジペプチドを形成するものであれば特に限定なく公知のものを使用できる。本発明においては、特にL-グルタミンまたはL-アスパラギンを用いることが好ましい。

【0044】

出発原料であるL-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸の濃度は各々1mM～10M、好ましくは0.05M～2Mであるが、L-アミノ酸エステルに対してL-アミノ酸を等量以上添加したほうが好ましい場合がある。また、必要なら

ば、例えば基質が高濃度だと反応を阻害するような場合には、反応中にこれらを阻害しない濃度にして逐次添加する事ができる。

【0045】

反応温度は3～70℃、好ましくは5～50℃であり、反応pHはpH2～12好ましくはpH3～11である。かくして2～48時間程度反応を行うことにより、反応混合物中にジペプチドが生成蓄積する。

【0046】

【実施例】

以下実施例をあげて、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例におけるL-アラニン、L-アラニル-L-グルタミンまたはL-アラニル-L-アスパラギンの定量は高速液体クロマトグラフィーを用いる方法（カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-2、溶離液：リン酸水溶液（pH2.2、5.0mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液／メタノール＝100／15、流量：1.0mL/min、検出210nm）により行った。

【0047】

実施例1 L-アラニル-L-グルタミン生成に対するEDTAの添加効果

1L中にグルコース 5g、硫酸アンモニウム 5g、リン酸一カリウム 1g、リン酸二カリウム 3g、硫酸マグネシウム 0.5g、酵母エキス 10g、ペプトン 10gを含む培地（pH7.0）50mLを500mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌した。これに同組成を含む斜面寒天培地（寒天2g/L、pH7.0）にて30℃、24時間培養した*Pseudomonas putida* FERM P-18544を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で17時間振とう培養を行った。培養後菌体を遠心分離し、湿菌体として100g/Lになるように100mM 1Mホウ酸緩衝液（pH9.0）にて懸濁した。菌体懸濁液1mLを、EDTA無添加、もしくはEDTA20mMを含み、L-アラニンエチルエステル塩酸塩200mM、及びL-グルタミン400mMを含む100mMホウ酸緩衝液（pH9.0）1mL（基質溶液）にそれぞれ添加し、全量を2mLとした後、30℃にて1時間反応をおこなった。この結果、EDTA無添加区

では4.9 mM, EDTA添加区では10.1 mMのL-アラニル-L-グルタミンが生成した。尚、これらの反応系において、菌体懸濁液の代わりに100 mMホウ酸緩衝液(pH 9.0) 1 mLを基質溶液1 mLに添加した条件(菌体無添加区)、および基質溶液の代わりに、L-アラニンエチルエステル塩酸塩とグルタミンを含まない、EDTA無添加あるいは20 mM EDTAを含有する100 mMホウ酸緩衝液(pH 9.0) 1 mLを菌体懸濁液に添加した条件(基質無添加区)では、いずれの場合もL-アラニル-L-グルタミンの生成は見られなかった。

【0048】

実施例2 基質としてのアミノ酸エステル

実施例1と同様に調製した*Pseudomonas putida* FERM P-18544の菌体懸濁液湿菌体(100 g/L) 1 mLを、EDTA 20 mMと下記のL-アラニンエステル塩酸塩200 mM、及びL-グルタミン400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液(pH 9.0) 1 mLにそれぞれ添加し、全量を2 mLとした後、30℃にて1時間反応をおこなった。この結果、L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質した場合には、14.9 mM、L-アラニンエチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質した場合には、11.4 mM、L-アラニン-tert-ブチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質した場合には、0.5 mMのL-アラニル-L-グルタミンが生成した。

【0049】

実施例3 基質としてのL-アミノ酸

実施例1と同様に調製した*Pseudomonas putida* FERM P-18544の菌体懸濁液湿菌体(100 g/L) 1 mLを、EDTA 20 mMとL-アラニンメチルエステル塩酸塩200 mM、及びL-グルタミンあるいはL-アスパラギン400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液(pH 9.0) 1 mLにそれぞれ添加し、全量を2 mLとした後、30℃にて1時間反応を行った。この結果、L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質した場合には、12.7 mMのL-アラニル-L-グルタミン、L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-アスパラギンを基質した場合には、4.8 mMのL-アラニル-L-アスパラギンが生成

した。

【0050】

実施例4 L-アラニル-L-グルタミンを生成する微生物

細菌の培養には、1 L中にグルコース 5 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸一カリウム 1 g、リン酸二カリウム 3 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 gを含む培地 (pH 7.0) 50 mLを500 mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌したものを用いた。これに1 L中にグルコース 5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 g、NaCl 5 gを含む斜面寒天培地 (寒天 2 g/L、pH 7.0) にて30℃、24時間培養した下表に示す細菌を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で17時間振とう培養を行った。培養後菌体を遠心分離し、湿菌体として100 g/Lになるように10 mMのEDTAを含む0.1 Mホウ酸緩衝液 (pH 9.0) にて懸濁した。酵母の培養には、1 L中にグルコース 5 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸一カリウム 1 g、リン酸二カリウム 3 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、酵母エキス 5 g、マルツエキス 5 g、ペプトン 10 gを含む培地 (pH 6.0) 50 mLを500 mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌したものを用いた。これに1 L中にグルコース 5 g、酵母エキス 5 g、マルツエキス 5 g、ペプトン 10 g、NaCl 5 gを含む斜面寒天培地 (寒天 2 g/L、pH 6.0) にて30℃、24時間培養した下表に示す酵母を1白金耳接種し、25℃、120往復/分、で17時間振とう培養を行った。培養終了後、これらの培養液から菌体を遠心分離し、湿菌体として100 g/Lになるように10 mMのEDTAを含む0.1 Mホウ酸緩衝液 (pH 9.0) にて懸濁した。これらの細菌、酵母の菌体懸濁液0.1 mLに、EDTA 10 mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 200 mM、及びL-グルタミン 400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 0.1 mLをそれぞれ添加し、全量を0.2 mLとした後、25℃にて2時間反応をおこなった。このときのL-アラニル-L-グルタミン (Ala-Gln) の生成量を表1、2に示す。

【0051】

【表1】

微生物	Ala-Gln (mM)
<i>Achromobacter delmarvae</i> FERM BP-6988	4.2
<i>Acinetobacter johnsonii</i> ATCC 9036	3.8
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	1.8
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IFO 3058	8.2
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	6.3
<i>Arthrobacter citreus</i> ATCC 11624	2.7
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.1
<i>Beijerinckia indica</i> ATCC 9037	13.0
<i>Brevibacterium roseum</i> ATCC 13825	2.6
<i>Clavibacter michiganense</i> ATCC 7429	1.9
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> ATCC 13253	3.2
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13286	7.2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 13071	1.0
<i>Empedobacter brevis</i> FERM P-18545	45.0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0.8
<i>Erwinia amylovora</i> IFO 12687	0.9
<i>Flavobacterium resinovorum</i> ATCC 12524	3.8
<i>Kluyvera citrophila</i> FERM BP-6564	3.1
<i>Microbacterium imperiale</i> ATCC 8365	4.3
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 11880	0.9
<i>Mycoplana bullata</i> ATCC 4278	7.1
<i>Pantoea ananatis</i> 23822	0.7
<i>Propionibacterium shermanii</i> FERM P-9737	2.9
<i>Pseudomonas putida</i> FERM P-18544	14.8

【表 2】

微生物	Ala-Gln (mM)
<i>Listonella anguillarum</i> ATCC 19264	2.9
<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 4720	10.2
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 21198	7.0
<i>Salmonella typhimurium</i> FERM BP-6566	1.6
<i>Sarcina lutea</i> FERM BP-6562	1.9
<i>Serratia grimesii</i> ATCC 14460	0.8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC13270	1.2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	0.7
<i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC 11924	5.1
<i>Vibrio tyrogenes</i> FERM BP-5848	30.0
<i>Xanthomonas maltophilia</i> FERM BP-5568	9.8
<i>Bullera alba</i> FERM P-8032	1.8
<i>Candida krusei</i> IFO 0011	1.3
<i>Cryptococcus terreus</i> IFO 0727	2.9
<i>Filobacidium capsuligenum</i> IFO 1119	0.6
<i>Geotrichum amycelium</i> ATCC 56046	10.6
<i>Pachysolen tannophilus</i> IFO 1007	1.9
<i>Rhodosporidium diobovatum</i> IFO 1829	4.8
<i>Rhodotorula minuta</i> IFO 0879	3.9
<i>Saccharomyces unisporus</i> IFO 0724	4.6
<i>Sporoboromyces salmonicolor</i> IFO 1038	5.2
<i>Tremella foliacea</i> IFO 9297	1.9
<i>Torulasporea delbrueckii</i> IFO 1083	1.8
<i>Torulopsis ingeniosa</i> FERM P-665	2.1

【0 0 5 2】

実施例 5 L-アラニル-L-グルタミン生成に及ぼす温度の影響

実施例 4 の細菌の培養法に従って調製した *Pseudomonas putida* FERM P-18544 と *Empedobacter brevis* FERM P-18545 の菌体懸濁液 (100 g/L) 1 mL を、EDTA 10 mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 200 mM、L-グルタミン 400 mM を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 mL にそれぞれ添加し、全量を 2 mL とした後、20℃、30℃、40℃にてそれぞれ 1 時間反応をおこなった結果を表 3 に示した。L-アラニル-L-グルタミン (Ala-Gln) の生成は、*Pseudomonas putida* FERM P-18544 の場合には 40℃において最も高い値を示したが、これに対して *Empedobacter brevis* FERM P-18545 においては、20℃で最も高い値を示した。

【0053】

【表3】

微生物	生成 Ala-Gln (mM)		
	20℃	30℃	40℃
<i>Pseudomonas putida</i> FERM P-18544	8.2	16.9	20.8
<i>Empedobacter brevis</i> FERM P-18545	57.9	23.6	6.5

【0054】

実施例6 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13286からのペプチド生成酵素の精製と精製酵素によるL-アラニル-L-グルタミンの生産

1 L中にグルセロール 5 g、酵母エキス 5 g、ペプトン 5 g、NaCl 5 g、L-アラニンアミド 5 gを含む培地 500 mLを5 L坂口フラスコに分注し、120℃、20分殺菌した。これに、上記と同じ組成の培地で20時間培養した*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13286の培養液を5% (V/V) になるように植菌し、30℃、120往復/分で20時間培養した。この培養液8 Lから遠心分離により菌体を集めた。以下の操作は氷上あるいは4℃にて行った。菌体を50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄後、0.1 mm径のガラスビーズをもちいて約10分間破碎処理を行った。ガラスビーズと菌体破碎液を分離し、20,000×g、30分の遠心分離にて破碎菌体片を除去し、無細胞抽出液を得た。更に200,000×g、60分の超遠心分離にて不溶性画分を除去し、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分に硫酸アンモニウムを60%飽和になるように添加し、20,000×g、30分の遠心分離によって沈殿を回収した。得られた沈殿を少量の50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。この酵素液を50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したQ-Sepharose HPカラムに供し、0~1.0 M塩化ナトリウムを含む50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分を集め、50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したSuperdex 200 pgに供し、同緩衝液で酵素を溶出させた。活性画分を集め、0.5 M硫酸アン

モニウムを含む 20 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析を行い、0.5 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化した Phenyl-Sepharose HP に供した。0.5 ~ 0 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分を集め、50 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、これを 50 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化した MonoQ カラムに供し、0 ~ 1.0 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。こうしてペプチド精製酵素を電気泳動適に均一に精製した。本精製酵素の比活性は 9.841 Unit/mg で、これらの精製過程を通じて当該ペプチド精製酵素の比活性は約 246 倍に上昇した。また、本精製酵素標品の分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した結果、分子量 42,000 ~ 46,000 と算出される位置に均一なバンドが検出された。尚、酵素の力価の測定は以下の通り行った。トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) 200 μ mol、L-アラニンアミド 50 μ mol および適量の酵素液を加え、全量が 1 ml となるように混合し、30℃にて 60 分間反応させた後、リン酸水溶液 (pH 2.1) を 4 ml 加え反応を停止した。生成したアラニン的高速液体クロマトグラフィーで定量し、1 分間に 1 μ mol の L-アラニンを生成する酵素量を 1 単位とした。

この精製酵素を EDTA、L-アラニンメチルエステル塩酸塩、及び L-グルタミン (あるいは L-アスパラギン) を含むホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、全量が 1 mL になるように混合 (終末濃度として、酵素添加量はアラニンアミド分解活性として 2 Unit、EDTA 10 mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 100 mM、L-グルタミン 200 mM (あるいは L-アスパラギン 200 mM)、ホウ酸緩衝液 100 mM) し、30℃にて 4 時間反応させた (尚、酵素の unit 数はアラニンメチルエステルとグルタミンからのアラニルグルタミン生成活性ではなく、簡便なアラニンアミド分解活性で示した)。このとき L-アラニル-L-グルタミンの生成量は 50.2 mM、L-アラニルアスパラギンの生成量は 49.8 mM であった。

【0055】

【発明の効果】

本発明のジペプチドの製造方法により、複雑な合成方法を経ることなく、安価に入手可能なＬ－アミノ酸エステルとＬ－アミノ酸を用いてジペプチドを製造することができ、医薬品素材、機能性食品等として有用なジペプチドの製造コストダウンが可能となる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 安価に入手可能な出発原料を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法を提供する。

【解決手段】 L - アミノ酸エステルと L - アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または該微生物の菌体処理物を用いて、L - アミノ酸エステルおよび L - アミノ酸からジペプチドを製造する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 3 1 0 5 4 7
受付番号	5 0 1 0 1 4 8 4 4 0 8
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0 0 9 2
作成日	平成 1 3 年 1 0 月 9 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成13年10月 5日

次頁無

特願 2 0 0 1 - 3 1 0 5 4 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 0 6 6]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名

味の素株式会社